

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-107989

(43) 公開日 平成7年(1995)4月25日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/60		7432-4B		
C 0 7 D 407/12	3 0 7			
// (C 1 2 P 19/60				
C 1 2 R 1:645)				

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平5-258778

(22) 出願日 平成5年(1993)10月15日

(71) 出願人 000006091

明治製菓株式会社

東京都中央区京橋2丁目4番16号

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 馬込 恵子

神奈川県横浜市港北区師岡町760 明治製

菓株式会社薬品総合研究所内

(72) 発明者 五味 修一

神奈川県横浜市港北区師岡町760 明治製

菓株式会社薬品総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

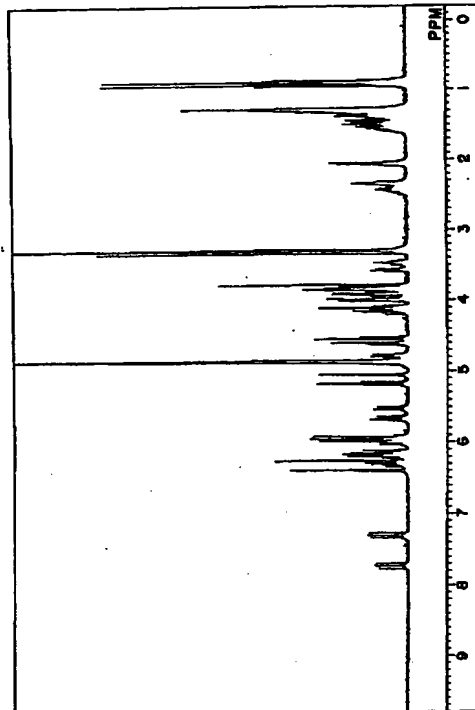
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規抗生物質MK8062物質およびその製造法

(57) 【要約】

【目的】 抗真菌活性を有する新規抗生物質を提供する。

【構成】 トリコセシウム エスピー D2640株を、通常の微生物が利用しうる栄養物を含有する培地で培養し、得られた培養物中から溶剤抽出法、シリカゲル・カラムクロマトグラフィー法等を用いて、分子式 $C_{48}H_{84}O_{17}$ で表される新規抗真菌性抗生物質MK8062物質を単離する。



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 遊離酸として下記の理化学的性状を有するMK8062物質またはその薬学的に許容される無機塩基あるいは有機塩基の塩。

(a) 色および形状：白色粉末

(b) 分子式： $C_{48}H_{44}O_{17}$

(c) マススペクトル (FD-MS)：899 (M+N a)⁺

(d) 比旋光度： $[\alpha]_D^{25} = +3.6^\circ$ (c 1.0, CH₃OH)

(e) 紫外外部吸収スペクトル
 λ_{max} nm (E_{1%}^{1cm})

[MeOH]：206(599), 224(470), 231(473), 263(614)

[0.1N HCl-MeOH]：205(521), 225(450), 231(454), 264(627)

[0.1N NaOH-MeOH]：214(1167), 260(615), 300(90), 312(50)

(f) 赤外部吸収スペクトル

(KBr cm⁻¹)：3416, 2928, 2859, 1698, 1636, 1460, 1414, 1379, 1333, 1310, 1269, 1202, 1150, 1090, 1069, 1044, 1009, 972, 868, 853, 828, 808, 768, 749, 710

(g) ¹H NMRスペクトル (400 MHz, CD₃OD)

δ (ppm)：0.97(3H, t), 1.02(3H, t), 1.36~1.50(6H, m), 1.43~1.64(2H, m), 1.50~1.70(2H, m), 2.14(2H, dt), 2.43(2H, m), 2.52(2H, m), 3.55(1H, m), 3.65(1H, d t), 3.90~3.97(5H, m), 4.00(1H, dd), 4.07(2H, m), 4.20~4.23(3H, m), 4.62(1H, d), 4.70(1H, d), 4.87(1H, d), 5.14(1H, d), 5.26(1H, t), 5.61(1H, dd), 5.75(1H, dt), 6.01(1H, m), 6.03(1H, d), 6.05(1H, d), 6.07(1H, dd), 6.23(2H, m), 6.28(1H, dd), 6.35(1H, d), 6.40(1H, dd), 6.48(1H, d), 7.39(1H, dd), 7.81(1H, dd)

(h) ¹³C NMRスペクトル (100 MHz, CD₃OD)

δ (ppm)：168.8 s, 168.8 s, 159.4 s, 158.7 s, 146.7 d, 143.2 s, 142.8 d, 141.8 d, 141.3 d, 136.1 d, 134.0 d, 132.1 d, 131.9 d, 131.0 d, 127.8 d, 122.0 d, 121.4 d, 114.5 s, 110.2 d, 109.3 d, 104.4 d, 84.9 d, 82.7 d, 81.5 d, 78.9 d, 78.7 d, 77.8 d, 76.4 d, 73.2 d, 72.6 d, 72.0 d, 69.6 d, 67.8 t, 63.7 t, 61.2 t, 42.2 t, 37.5 t, 33.7 t, 32.6 t, 31.2 t, 30.2 t, 25.7 t, 23.6 t, 14.4 q, 10.4 q,

(i) 溶解性：メタノール、酢酸エチルに可溶で、クロロホルムに極めて難溶であり、水に不溶である。

(j) 塩基性、酸性、中性の区別：弱酸性物質

【請求項2】 請求項1記載のMK8062物質を生産するトリコセシウム (Trichothecium) 属に属する真菌を培養して、MK8062物質を培養物に生成蓄積せし

め、その培養物から採取することを特徴とするMK8062物質の製造法。

【請求項3】 前記トリコセシウム属に属する真菌が、トリコセシウム エスピー D2640 (FERM P-13904)であることを特徴とする請求項2記載のMK8062物質の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規抗生物質MK8062物質またはMK8062物質の塩、ならびにその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、微生物が生産する種々の抗生物質が知られており、医薬品、動物薬、農薬等の分野で実用化されている。しかしその一方で、従来用いられている抗生物質に対する耐性を獲得した薬剤耐性菌の出現となるために、新規な作用を有する抗生物質の開発が常に要望されている。特に、真菌に対して実質的に有効な抗生物質は少ないのが現状である。

【0003】尚、本発明によるMK8062物質と基本骨格がある程度類似する化合物としては、パブラカンジンA、B、C、D、E (Papulacandins) (Traxlerら、J. Antibiotics 30：289~296, 1977)、カエティアカンジン (Chaetiacandin) (Komoriら、J. Antibiotics 38：455~459, 1985)、L-687, 781 (VanMiddlesworthら、J. Antibiotics 44：45~51, 1991)、Mer-WF3010 (Kanetoら、J. Antibiotics 46：247~250, 1993)等が知られているが、MK8062物質は、これらの既知化合物とは理化学的性状が異なり明確に区別される新規化合物である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記観点からなされたものであり、新規抗生物質、特に真菌に対して有効な抗生物質とその製造法を提供することを課題とする。

【0005】

【問題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために、不完全菌類に属する1菌株の培養物中から強い抗真菌活性を有する新規抗生物質MK8062物質を単離し、本発明を完成させた。

【0006】以下、本発明を詳細に説明する。

<1>新規抗生物質MK8062物質

第1の本発明の要旨とするところは、遊離酸として下記の理化学的性状を有するMK8062物質またはその薬学的に許容される無機塩基あるいは有機塩基の塩である。本発明によるMK8062物質の遊離酸としての理化学的性状、及び生物学的性質は次の通りである。

【MK8062物質の理化学的性状】

(1) 色および形状：白色粉末

(2) 分子式： $C_{48}H_{44}O_{17}$

(3) マススペクトル (FD-MS) : 899 (M+N a)'

(4) 比旋光度 : $[\alpha]_D^{25} = +3.6^\circ$ (c 1.0, CH₃OH)

(5) 紫外外部吸収スペクトル

λ_{\max} nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$)

[MeOH] : 206(599), 224(470), 231(473), 263(614)

[0.1N HCl-MeOH] : 205(521), 225(450), 231(454), 264(627)

[0.1N NaOH-MeOH] : 214(1167), 260(615), 300(90), 312(50)

(6) 赤外部吸収スペクトル

(KBr cm^{-1}) : 3416, 2928, 2859, 1698, 1636, 1460, 1414, 1379, 1333, 1310, 1269, 1202, 1150, 1090, 1069, 1044, 1009, 972, 868, 853, 828, 808, 768, 749, 710

(7) ¹H NMRスペクトル (400MHz, CD₃OD)

δ (ppm) : 0.97(3H, t), 1.02(3H, t), 1.36~1.50 (6H, m), 1.43~1.64(2H, m), 1.50~1.70(2H, m), 2.14(2H, dt), 2.43(2H, m), 2.52(2H, m), 3.55(1H, m), 3.65(1H, d t), 3.90~3.97(5H, m), 4.00(1H, dd), 4.07(2H, m), 4.20*

* ~4.23(3H, m), 4.62(1H, d), 4.70(1H, d), 4.87(1H, d), 5.14(1H, d), 5.26(1H, t), 5.61(1H, dd), 5.75(1H, dt), 6.01(1H, m), 6.03(1H, d), 6.05(1H, d), 6.07(1H, dd), 6.23(2H, m), 6.28(1H, dd), 6.35(1H, d), 6.40(1H, dd), 6.48(1H, d), 7.39(1H, dd), 7.81(1H, dd)

(8) ¹³C NMRスペクトル (100MHz, CD₃OD)

δ (ppm) : 168.8 s, 168.8 s, 159.4 s, 158.7 s, 146.7 d, 143.2 s, 142.8 d, 141.8 d, 141.3 d, 136.1 d, 134.0 d, 132.1 d, 131.9 d, 131.0 d, 127.8 d, 12.0 d, 121.4 d, 114.5 s, 110.2 d, 109.3 d, 104.4 d, 84.9 d, 82.7 d, 81.5 d, 78.9 d, 78.7 d, 77.8 d, 76.4 d, 73.2 d, 72.6 d, 72.0 d, 69.6 d, 67.8 t, 63.7 t, 61.2 t, 42.2 t, 37.5 t, 33.7 t, 32.6 t, 31.2 t, 30.2 t, 25.7 t, 23.6 t, 14.4 q, 10.4 q.

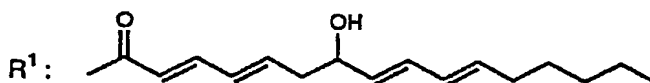
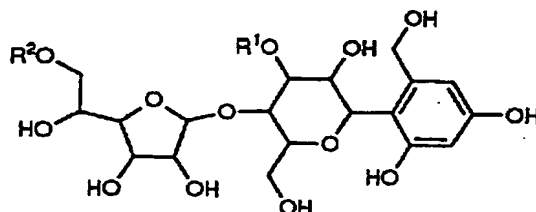
(9) 溶解性 : メタノール、酢酸エチルに可溶で、クロロホルムに極めて難溶であり、水に不溶である。

(10) 塩基性、酸性、中性の区別 : 弱酸性物質

上記の物理化学的性状から、MK8062物質の構造は下記式のように推定される。

[0007]

[化1]



[0008] [MK8062物質の生物活性] 本発明によるMK8062物質の各種真菌に対する最小発育阻止濃度を、寒天平板希釈法 (イースト・モルフォロジー・アガー : Yeast morphology agarを用い、27℃で72 ※

※時間培養) によって調べた。結果を表1に示す。

[0009]

[表1]

表1

被 検 菌	最小発育阻止 濃度($\mu\text{g/ml}$)
カンディダ アルビカンス (Candida albicans) TIMM 1768	0.20
カンディダ アルビカンス (Candida albicans) C-a-24	0.39
カンディダ グラブラタ (Candida glabrata) IFO-0005	0.78
カンディダ キリエモンデイ (Candida guilliermondii) IFO-0622	1.56
カンディダ トロピカリス (Candida tropicalis) IFO-0589	0.20
カンディダ キリエモンデイ (Candida guilliermondii) IFO-1972	1.56
カンディダ クルセイ (Candida krusei) IFO-0584	6.25
カンディダ パラプシロシス (Candida parapsilosis) IFO-0585	0.20
クリプトコッカス ネオフォルマンス (Cryptococcus neoformans) Cr-1	>100
クリプトコッカス ネオフォルマンス (Cryptococcus neoformans) INC F-10	>100
サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) X2180-1A	6.25
アスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) saito	>100
アスペルギルス フミガタス (Aspergillus fumigatus) TIMM 1775	>100

このように、本発明のMK8062物質は、強い抗真菌活性を有する新規抗生物質である。この活性は、MK8062物質の遊離酸のみならず、その塩も同様に有する。塩の種類としては特に制限されないが、通常、薬学的に許容される無機塩基あるいは有機塩基が好ましい。例えば、無機塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属化合物、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等のアルカリ土類金属化合物あるいはアンモニア等が、有機塩基としては、エタノールアミン、トリエチルアミン、ジシクロヘキシルアミン等が挙げられる。

【0010】MK8062物質の塩類は、常法により遊離の形に変化させることができ、また、遊離の形で得られたMK8062物質を上に掲げた塩基等により常法で対応するその塩類に変化させることができる。従って、MK8062物質の塩類も、遊離酸同様に本発明の範囲内に包含される。

<2>本発明のMK8062物質の製造法

第2の本発明の要旨とするところは、前記MK8062物質を生産する微生物を培養して、MK8062物質を培養物中に生成蓄積せしめ、その培養物から採取することを特徴とするMK8062物質の製造法である。尚、本明細書において、「培養物」とは、菌体及び／又は培地をいうものとする。

(1) MK8062物質の製造に用いる微生物

MK8062物質を生産する微生物としては、例えばトリコセシウム (Trichothecium) 属に属するMK8062物質生産菌が挙げられる。具体的には、本発明者らが分離したトリコセシウム エスピー (Trichothecium s p.) D2640 (以下、「本菌株」または「D2640」と略することがある) が、より好ましい生産菌であ

る。

【0011】本菌株の菌学的性状は、以下の通りである。なお本菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13904として寄託されている。

【菌学的性状】

(i) 形態学的性状

コロニーの生育は、LCA (三浦培地) 上、27℃、7日間で旺盛である。コロニーは薄く広がり、はじめは無色であり、後に培養が古くなると、淡黄茶色に色づく。基底菌糸は分枝し、隔壁を有し、巾1.6 μm に至る。

30 気生菌糸は殆ど形成されない。

【0012】厚膜胞子は、基底菌糸中に、単独又は鎖状、頂生又は節間生で多数形成される。胞子の形状は、球形、楕円形、樽形あるいは不規則な形を呈する。分生子柄は、基底菌糸より直立して生じ、単生で分枝せず、長さは80~150 μm 、巾は2.0~3.8 μm であり、無色である。

【0013】分生子の形成は独特で、分生子柄先端は左右交互に突出膨大して分生子を形成し、各分生子は基端部で次の分生子の下半細胞の側面につながる (Retrogressive)。

【0014】分生子は、円筒形で細胞のほぼ中央部に隔壁が挿入され、2細胞となる。形状は上下対称、基部は裁断状であり、大きさは(11.8~12.8) μm × (3.8~5.3) μm 、色は無色で、表面は平滑である。

(ii) 各種培地上における性状

①ポテト・デキストロース寒天培地 (PDA) 上で27℃、2週間培養したときの性状

コロニーの生育は旺盛、コロニーは薄く広がり平坦状、のちに中央部周辺で不規則なしわを生じ、橙褐色を呈

す。基底菌糸は分枝し、隔壁を有し、無色である。厚膜胞子は、基底菌糸中に、単独又は鎖状、頂生又は節間生で多数生じ、形状は球形、楕円形、樽形あるいは不規則形である。気生菌糸はコロニーの中央部に生じる。分生子の形成は貧弱である。

②麦芽寒天培地 (MA) 上で27℃、2週間培養したときの性状

コロニーの生育は、中程度であり、コロニーはコンパクトに形成され、平坦状であり、淡橙色〜にぶ橙色を呈する。基底菌糸は分枝し、隔壁を有し、無色である。厚膜胞子は基底菌糸中に、単独又は鎖状、頂生又は節間生で多数生じ、形状は楕円形、樽形あるいは不規則形である。気生菌糸は殆ど形成されない。分生子はコロニー周辺部に豊富に形成される。

(iii) 生理学的性状

生育温度 (PDA上、7日間培養) : 10~37℃

至育温度 : 20~30℃

生育pH (LCA液体培養上、27℃、7日間培養) : 3~9

至適pH : 4~6

(iv) 分類学的考察

本菌株 (D2640) は、1) 分生子形成は独特で、分生子柄先端は左右交互に突出膨大して分生子を形成し、各分生子は基端部で次の分生子の下半細胞の側面につながるRetrogressive形の様式を示す。2) 分生子は中央部に1個の隔壁を有する。

【0015】 G. T. Cole & R. A. Samson (1979) の "Pat*

* terms of Development in Conidial Fungi" P. 84~95によれば、Retrogressive型の分生子形成細胞を持つ菌として、クラドボツリウム (*Cladobotryum*) 属、トリコセシウム (*Trichothecium*) 属、バシペトスポラ (*Basipetospora*) 属があるが、上記性状から、本菌株 (D2640) は、クラドボツリウム属及びバシペトスポラ属から明確に区別され、トリコセシウム属の特徴に合致した。従って本菌株 (D2640) は、不完全菌亜門 (Deuteromycotina) - 不完全糸状菌綱 (Hyphomycete s) のトリコセシウム属に帰属する。

【0016】 M. A. Rifai & R. C. Cooke (1966) (*Trans. Br. Mycol. Soc.* 49: 147-168) のトリコセシウム属のモノグラフによれば、本属に4種を認めている (トリコセシウム *T. roseum*、トリコセシウム *T. luteum*、トリコセシウム *T. parvum*、不完全菌状態にあるトリコセシウム (*Trichothecium* state of *Hyphomyces*))。これら4種の内1種は、K. Tubaki (Nagao 7:29-34, 1960) によって発見された新種で、核菌類の1種ハイフォミセス トリコセコイデス (*Hyphomyces trichothecoides*) のアナモルフである。

【0017】 これらの菌種は、コロニーの色調、分生子柄の分枝、分生子の形態によって区別されている。これらの公知菌種と本菌株について、コロニーの色調、分生子柄の分枝、分生子の形態を表2に示す。

【0018】

【表2】

	トリコセシウム エスピー-D2640	トリコセシウム ロゼウム	トリコセシウム ルチウム	トリコセシウム パールウム	ハムフィニウス トリコセコイデス
コロニー色調	淡褐色～にぶ橙色	桃色	淡橙色～ クリーム色	白色～ 淡黄灰色	淡黄色～ 赤味黄色
分生子柄	分枝せず 長さ80～150 μm 巾2.0～3.8 μm	分枝せず 100～600 μm 2.5～4 μm	分枝せず —— 3.0～4.5 μm	通常分枝せず稀に分枝 120～200 μm 2.5～3.0 μm	分枝する —— 3.5～5 μm
分生子形成様式	Retrogressive アレウロ型分生子	Retrogressive アレウロ型	Retrogressive アレウロ型	Retrogressive アレウロ型	Retrogressive アレウロ型
分生子の形態	円筒形、2細胞 11.8～12.8 \times 3.8～5.3 μm	洋なし形、 2細胞 12～20 \times 7～11 μm	倒卵形～倒卵状 の楕円形、2細胞 16～32.7 \times 10.5～15.4 μm	倒卵形～楕円形、 2細胞 11.3～16.3(-19) \times 6.3～8.5(-10) μm	長い洋なし形、棍 棒形、2～3細胞 20～35 \times 5.5～7.0 μm

【0019】表2に示したように、本菌株(D2640)は、分生子が円筒形で、(11.8～12.8) $\mu\text{m} \times$ (3.5～5.3) μm の大きさを有すること、分生子柄は無分枝であることから、これらの公知の4種のいずれとも異なっていた。従って、ここでは本菌類(D2640)をトリコセシウム エスピー(Trichothecium sp.)として扱い、種のレベルの同定については、将来の分類学的研究を待つことにする。

【0020】本菌株は、他の菌類に見られるようにその性状が変化し易い。例えば、本菌株に由来する突然変異株(自然発生または誘発性)、形質接合体または遺伝子

組換え体であっても、MK8062物質を生産するものは全て本発明の製造法に使用できる。

(2) MK8062物質生産菌の培養法

トリコセシウム属に属するMK8062物質生産菌を、微生物が利用しうる栄養物を含有する培地で培養する。

【0021】栄養源としては、従来放線菌の培養に利用されている公知のものが使用できる。例えば、炭素源としては、グルコース、水飴、デキストリン、澱粉、糖蜜、動・植物油等を使用しうる。また、窒素源としては、大豆粉、小麦胚芽、コーン・ステープ・リカー、綿実粕、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、硫酸アンモ

ニウム、硝酸ナトリウム、尿素等を使用しうる。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸およびその他のイオンを生成することができる無機塩類を添加することは有効である。また、菌の発育を助け、MK8062物質の生産を促進するような有機および無機物を適当に添加することができる。

【0022】培養法としては、好氣的条件での培養法、特に深部培養法が最も適している。培養に適当な温度は10～37℃であるが、多くの場合20～30℃付近で培養する。MK8062物質の生産は、培地や培養条件により異なるが、振盪培養、タンク培養のいずれにおいても通常2～7日間でその蓄積が最高に達する。培養中のMK8062物質の蓄積量が最高になった時に培養を停止し、培地から目的物質を単離精製するのが好ましい。

(3) MK8062物質の精製法

上記のような培養によって得られる培養物からMK8062物質を採取するに当たっては、その性状を利用した通常分離手段、例えば、溶剤抽出法、イオン交換樹脂法、吸着または分配カラムクロマト法、ゲルろ過法、透析法、沈殿法等を単独でまたは適宜組み合わせる抽出精製することができる。

【0023】例えば、培地中に蓄積されたMK8062物質は、水と混ざらない有機溶剤、例えば、酢酸エチル、ブタノール等で抽出すると有機溶剤層に抽出される。また培養菌体中からは、アセトン-水、メタノール-水または酢酸エチル等で抽出される。

【0024】MK8062物質を更に精製するには、シリカゲル（ワコーゲル C-200、和光純薬工業社製等）、アルミナ等の吸着剤やセファデックスLH-20（ファルマシア社製）、トヨパールHW-40（株式会社東ソー社製）等の樹脂を用いるクロマトグラフィーを行うとよい。

【0025】このようにして培養物中に生産されたMK8062物質は、遊離酸、すなわちMK8062物質それ自体として分離することができる。MK8062物質を含有する溶液またはその濃縮液を、各工程の操作中例えば抽出、分離または精製の各工程の操作中に、塩基、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属化合物、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等のアルカリ土類金属化合物あるいはアンモニアのような無機塩基、エタノールアミン、トリエチルアミン、ジシクロヘキシルアミン等の有機塩基で処理した場合、MK8062物質は対応するその塩類の形に変化し分離される。

【0026】また、このようにして製造されたMK8062物質の塩類は、常法により遊離の形に変化させることができる。更に、遊離の形で得られたMK8062物質を、前記の塩を用いて常法により対応するその塩類に

変化させてもよい。

【0027】

【実施例】以下に本発明の実施例を示すが、MK8062物質の性状が本発明によって明らかにされたので、それらの性状に基づきMK8062物質の製造法を種々考察することができる。従って本発明は、実施例に限定されるものではなく、実施例の修飾手段は勿論、本発明によって明らかにされたMK8062物質の性状に基づいて公知の手段を施してMK8062を生産、濃縮、抽出、精製する方法をすべて包括する。

【0028】尚、抗真菌活性成分の生物検定にはキャンディダ アルビカンスを用い、平板培地上でのキャンディダ アルビカンスの生育阻止を指標として活性画分の検出を行った。

<1>培養

水アメ2.0%、大豆粉1.0%、大豆油0.15%、サングレイン0.25%、綿実粕0.5%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%及び CaCO_3 0.1%を含有する培地（pH6.0）を40mlずつ200ml容三角フラスコ20本に分注し、121℃で20分間オートクレーブ滅菌した。

【0029】上記培地に、MK8062生産株であるトリコセシウム・エスピー D2640株を1白金耳ずつ植菌し、27℃で5日間、210回転/分にて振盪培養した。

【0030】上記培地とは別に、シュクロース3%、 NaNO_3 0.2%、 K_2HPO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 KCl 0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%を含有する主発酵培地（pH6.0）を調製し、その80mlを500ml容三角フラスコ100本に分注し、121℃で20分間オートクレーブ滅菌した。この主発酵培地に前記の種培養液を4mlずつ接種し、27℃で7日間、210回転/分にて振盪培養した。得られた培養液を遠心分離して、培養菌体を得た。

<2>抗真菌活性成分の抽出

得られた培養菌体中から、70%アセトン水（2.2L）で活性成分を抽出した。この抽出液から減圧下でアセトンを留去し、活性成分を含む水溶液（1.0L）を得た。この水溶液を10N水酸化ナトリウムでpH7に調製後、酢酸エチル（1.0L）で活性成分を抽出し、酢酸エチル層を濃縮乾固すると油状物質（205mg）を得られた。

【0031】この油状物質をシリカゲルカラム（50g）の上部に載せ、クロロホルム-メタノール（5:1）を展開溶媒とするクロマトグラフィーを行い、溶出液を3mlずつ分画した。溶出された活性画分（フラクション番号46～61）を濃縮乾固し、10.7mgの

白色粉末が得られた。

【0032】この粉末について、メタノール中（図1中実線）、0.1N塩酸-メタノール中（図1中破線）および0.1N水酸化ナトリウム-メタノール中（図1中、一点鎖線）での紫外吸収スペクトル、臭化カリウム錠での赤外部吸収スペクトル、重メタノール溶液中での400MHz ^1H NMRスペクトル、重メタノール溶液中での100MHz ^{13}C NMRスペクトルを、各々順に図1～4に示す。

【0033】MK8062物質について理化学的性状及び生物学的性質を調べた結果は、前述したとおりである。

【0034】

【発明の効果】本発明により得られるMK8062物質は、強い抗真菌活性を有している。この性質に基づき、*

* MK8062物質を抗真菌剤あるいはそれへの変換素材として用いることができる。

【図面の簡単な説明】

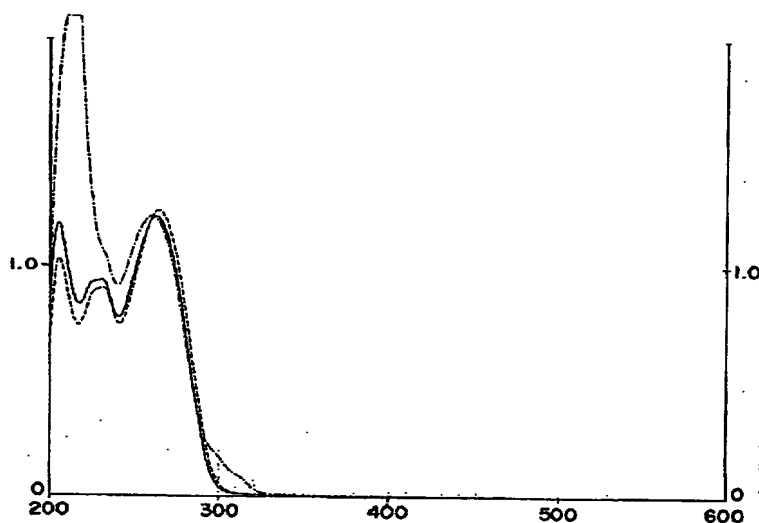
【図1】 MK8062物質のメタノール中（20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、実線で示す）、0.1N塩酸-メタノール中（20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、破線で示す）および0.1N水酸化ナトリウム-メタノール中（20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、一点鎖線で示す）での紫外吸収スペクトル。

【図2】 MK8062物質の臭化カリウム錠での赤外部吸収スペクトルを示す図。

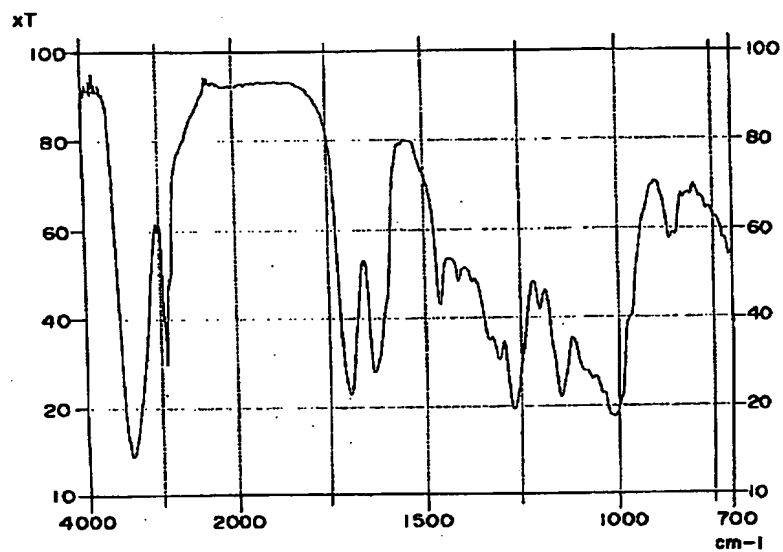
【図3】 MK8062物質の重メタノール溶液中での400MHz ^1H NMRスペクトル。

【図4】 MK8062物質の重メタノール溶液中での100MHz ^{13}C NMRスペクトル。

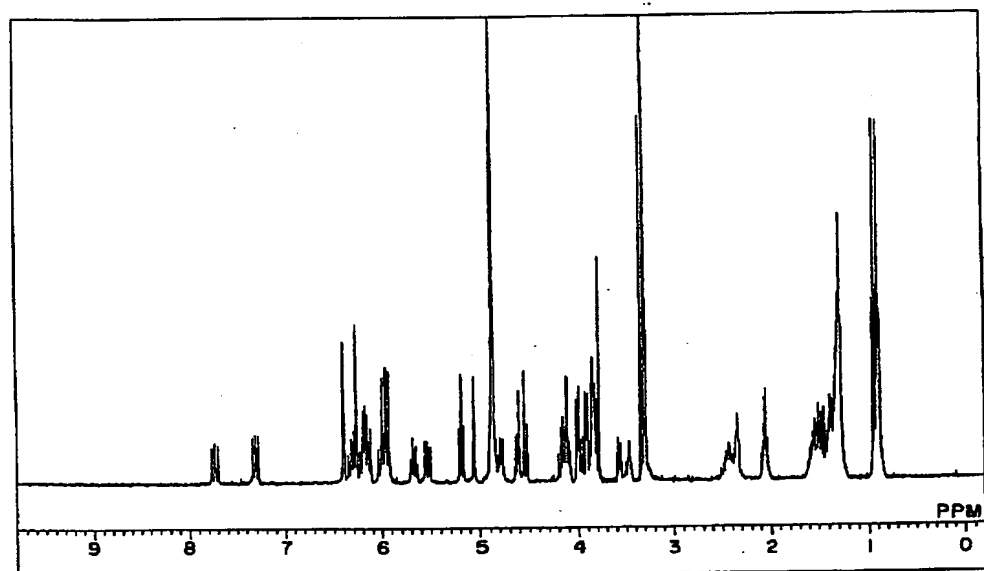
【図1】



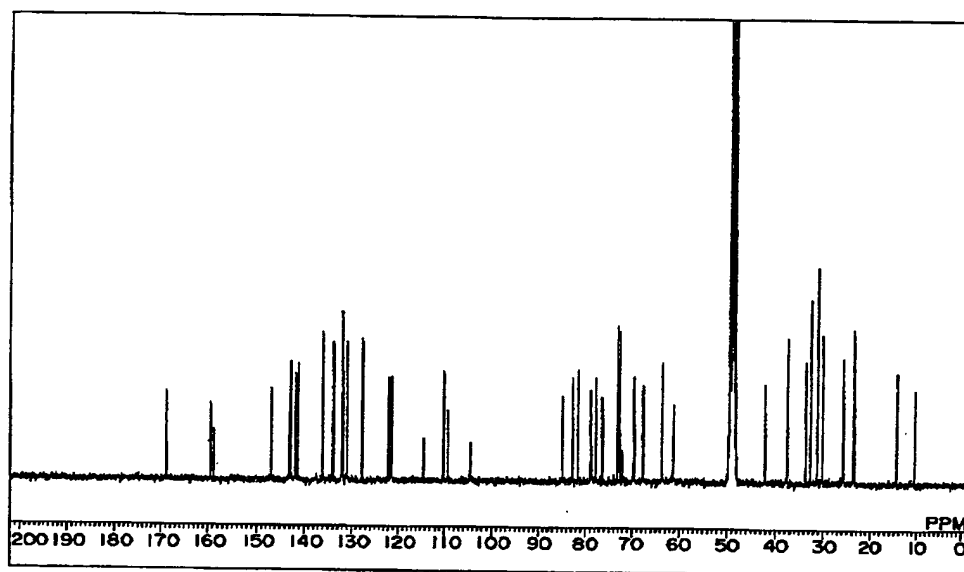
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 播磨谷 健蔵
神奈川県横浜市港北区師岡町760 明治製
菓株式会社薬品総合研究所内

(72)発明者 千葉 紀子
神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地三菱
化成株式会社総合研究所内

(72)発明者 太田 邦彦
神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地三菱
化成株式会社総合研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)